

An Immunosensor for Detection of 17 β -Estradiol Based on Screen-Printed Electrode with Nano-Gold and Protein-A *

YANG Yong¹, MU Jingnan¹, DING Yaping¹, WANG Junxia¹, LI Jianshuang¹, DU Xiaoyan^{1*}, CHANG Dong¹
(1. School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150081, China; 2. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: A immunosensor for detection of 17 β -estradiol was prepared by modifying nano-gold and protein-A on the surface of screen-printed electrode. The large specific surface area and high surface free energy of gold nanoparticles could make protein-A molecules immobilized firmly, and then protein-A was used to directionally immobilize the Fc portions of anti-17 β -estradiol antibody. Thus a immunosensor was developed for rapid detection of 17 β -estradiol by competitive enzyme-linked immunoassay. The modified process was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and cyclic voltammetry (CV). Under the optimized conditions, the immunosensor showed high sensitivity. There was a negative linear correlation between the current of reduction peak and the concentration of 17 β -estradiol in the range of 0.1 $\mu\text{g/L}$ ~ 20 $\mu\text{g/L}$ with a detection limit of 0.035 $\mu\text{g/L}$ (S/N = 3). When this immunosensor was used to determine the real normal human urine samples, the results were consistent well with high performance liquid chromatography method, and the recovery was in the range of 96% ~ 114%.

Key words: immunosensor; nano-gold; protein-A; 17 β -estradiol; screen-printed electrode

EEACC: 7230J doi: 10.3969/j.issn.1004-1699.2012.04.001

基于蛋白 A-纳米金-丝网印刷电极的雌二醇免疫传感器*

杨 勇¹, 牟婧男¹, 丁亚萍¹, 王俊霞¹, 李健爽¹, 杜晓燕^{1*}, 常 东²

(1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨医科大学附属第一医院, 哈尔滨 150001)

摘 要: 将蛋白 A 固定在纳米金修饰的丝网印刷电极表面, 纳米金大的比表面积以及较高的表面自由能使蛋白 A 比较牢固地固定在其上; 蛋白 A 分子可以定向结合 17 β -雌二醇抗体的 Fc 片段, 使抗体在电极表面有序固定化。利用 17 β -雌二醇和酶标 17 β -雌二醇的酶免疫竞争反应, 研制了快速测定 17 β -雌二醇的电化学传感器。用循环伏安法和扫描电子显微镜对修饰过程进行了表征。优化测定条件后, 传感器呈现了很高的测定灵敏度, 电流响应信号与 17 β -雌二醇浓度在 0.1 $\mu\text{g/L}$ ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的负线性相关, 检出限为 0.035 $\mu\text{g/L}$ (S/N=3)。应用该免疫传感器测定了正常人群尿样中 17 β -雌二醇含量, 测定范围与报道的高效液相色谱法测定结果相一致, 样品加标回收率为 96% ~ 114%。

关键词: 免疫传感器; 纳米金; 蛋白 A; 17 β -雌二醇; 丝网印刷电极

中图分类号: TP212.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2012)04-0423-05

环境雌激素 EEs (Environmental Estrogens) 可通过污水、食品、药品等进入到机体当中^[1], 进而危害机体的生殖系统、神经系统、免疫系统等, 并且可对肿瘤的发生产生影响^[2-3]。在各种环境雌激素中, 甾类雌激素的危害较大^[4]。雌二醇是一种甾类雌激素, 有 α 、 β 两种构型, 其中 17 β -雌二醇生物活性最强。目前报道的雌二醇测定方法有高效液相色谱法^[5]、液相色谱-质谱联用法^[6]、气相色谱-质谱联用法^[7] 及各种免疫分析法^[8-9] 等。基于免疫反应的电化学传感器, 分析时间短、操作简便且灵敏度较

高, 利于实现对样品的实时、现场、在线测定。相比放射免疫法 (RIA)、酶联免疫吸附法 (ELISA)、荧光免疫法 (FIA)、化学发光免疫分析法 (CLIA) 等免疫测定方法, 电化学免疫传感器是将抗体固定到电极表面, 方便与未反应的雌二醇抗原分离, 每次测定仅消耗几微升的试剂和样品, 因此免疫传感器在测定激素类物质中具有很好的应用前景^[10]。

蛋白 A 对抗体具有定向固定作用, 能使抗体上与抗原决定簇发生结合的活性片段一致朝外^[11], 避免了固定抗体取向的杂乱无章, 可提高抗体的利用

项目来源: 国家自然科学基金项目 (30972488)

收稿日期: 2011-11-14 修改日期: 2011-12-30

效率,并且蛋白 A 可避免抗体直接接触金属而失活。本研究选择一次性丝网印刷电极作为基础电极,印刷电极制作简单方便、成本低、重复性好,最重要的是印刷电极可实现快速平行测定,更利于实际应用和商品化^[12]。应用电化学法将纳米金沉积在丝网印刷电极的工作电极上,通过改变实验参数有效地控制了纳米颗粒的大小和密度。在纳米金上固定蛋白 A,通过蛋白 A 分子定向固定抗 17 β -雌二醇抗体。利用辣根过氧化物酶标记的雌二醇和样品中的雌二醇与固定化抗体发生酶免疫竞争反应,测定样品中 17 β -雌二醇含量。实验结果表明以蛋白 A 为载体固定抗体后能够极大地提高免疫反应的检测灵敏度,且辣根过氧化物酶对硫堇-过氧化氢体系有很好的催化作用,酶底物产生灵敏的电流信号。尿液中雌二醇含量可反映机体对环境雌激素的接触量,在临床上测定内源性雌激素有一定的意义,所以选择人体尿液作为测定对象,研究表明该免疫传感器对人尿液中雌二醇的测定结果较好。

1 实验部分

1.1 仪器

CHI660A 电化学工作站(上海辰华仪器公司);扫描电子显微镜-QUANTA200F(美国 FEI 公司);超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);电热恒温培养箱(上海市跃进医疗器械一厂);高速离心机(上海安亭科学仪器厂);丝网印刷电极(南京天鼎生物技术研究所以)。

1.2 试剂

蛋白 A(美国 IL 公司);硫堇(英国 Alfa Aesar 公司);氯金酸(美国 Acros Organics 公司);17 β -雌二醇(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司);辣根过氧化物酶标记的 17 β -雌二醇(天津天健生物制药公司);磷酸盐缓冲片(PBS, pH7.4)、兔抗 17 β -雌二醇抗体、牛血清白蛋白(BSA)均来自美国 Sigma 公司;甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯;实验用水为超纯水。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫电极的制备

实验中的电极如图 1,工作电极:直径 2.5 mm,银底碳电极;对电极:银底碳电极;参比电极:银-氯化银电极。取同一批次的电极用无水乙醇和去离子水各超声清洗 5 min,然后在 0.1 g/L 氯金酸溶液用恒电位法(-0.2 V)沉积 60 s,沉积前先向氯金酸溶液中通入高纯氮气 20 min 以除氧,沉积后用去离子水清洗表面,用高纯氮气吹干。

取 5 μ L 浓度为 1 g/L 蛋白 A 溶液滴加到工作电

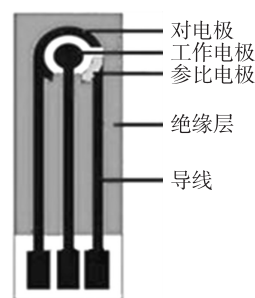


图 1 丝网印刷电极的组成

极表面,4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜,然后反复清洗表面,室温干燥。取 5 μ L 浓度为 0.1 g/L 兔抗 17 β -雌二醇抗体溶液滴加到工作电极上,放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中温育 1 h, PBS 清洗后用 1% 的 BSA 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中封闭 2 h,反复清洗,最后在工作电极表面滴一滴 pH7.4 的 PBS,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用(每一步反应结束后都用 pH7.4 的 PBS 反复清洗以除掉未结合的试剂)。

1.3.2 标准系列的测定

用 10% 的甲醇将 17 β -雌二醇配成一系列标准溶液,分别取 4 μ L 标准液和 4 μ L 酶标 17 β -雌二醇(稀释倍数为 1:100)滴加到免疫电极的工作电极上,用微量加样器在电极表面轻轻混合 3 次,放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中温育 30 min,用 PBS 反复清洗后在 1 mmol/L 的硫堇^[13]+0.03% H_2O_2 溶液(pH5.5 乙酸盐缓冲液配制)中用循环伏安法测定还原峰电流值,峰电流与雌二醇含量呈负相关。

1.3.3 尿中 17 β -雌二醇的测定

分别收集正常男性和女性尿样各 10 例测定。尿中的 17 β -雌二醇主要以结合态的形式存在,为了不影免疫反应,首先要对其进行解离。采用酸水解法^[14],取 0.5 mL 尿样于 4 mL 具塞离心管中,加入 0.05 mL 浓盐酸和 0.5 mL 甲醇,80 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,然后用 5 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 至 7.0~7.5,用 pH 7.4 的 PBS 稀释到 4 mL,此时尿样稀释 8 倍,10 000 rot/min 高速离心 10 min 后,取上清液检测,测定步骤按照 2.3。

2 结果与讨论

2.1 修饰纳米金条件的优化及表征

电极在 0.1 g/L 氯金酸溶液中,经不同时间沉积后,测定硫堇-过氧化氢体系的还原峰电流值。随着沉积时间的增加硫堇-过氧化氢体系的还原电流逐渐增大,当沉积时间增加到 60 s 以后峰电流变化不大,结果见图 2。对沉积时间为 60 s 的电极进行扫描电镜表征,结果如图 3 所示,金颗粒的平均粒径小于 30 nm,一致性较好。因此选择在 0.1 g/L 氯金酸溶液中-0.2 V 电压下沉积 60 s 作为沉积条件。

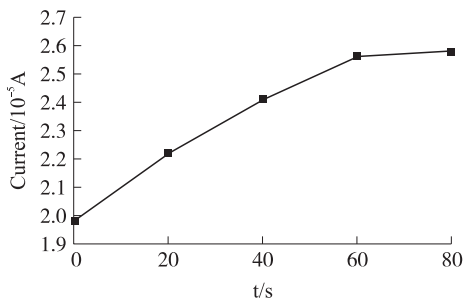


图2 纳米金沉积时间对响应信号的影响
测试底液为 1 mmol/L、pH 5.5 的硫堇+0.03% H_2O_2 溶液 (Scan rate: 100 mV/s)

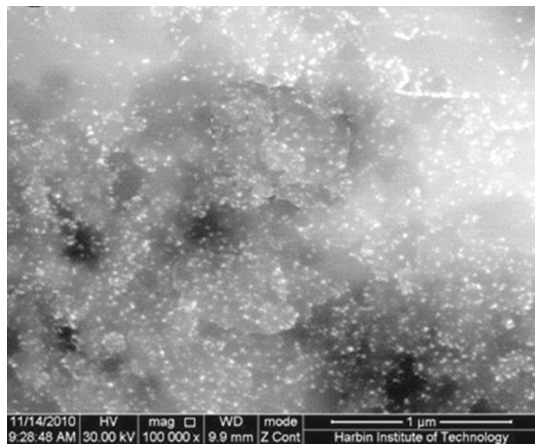


图3 沉积时间为 60 s 的扫描电镜图

2.2 修饰电极的循环伏安法表征

用循环伏安法表征不同修饰阶段的电极,如图 4 所示。与裸电极相比,修饰纳米金后电极在硫堇-过氧化氢溶液中的响应电流增大,这是因为修饰了纳米金后电极比表面积增大,有利于电活性物质的电化学反应、另外修饰纳米金后也加快了电极的电子传递。当纳米金上吸附蛋白 A 后响应电流下降,因为蛋白 A 大分子阻碍了电子传递。当蛋白 A 上固定抗体后电流再次下降,因为抗体为大分子蛋白质进一步阻碍电子传递。抗体与酶标抗原结合后电流有较大幅度的增长,是酶催化作用的结果。

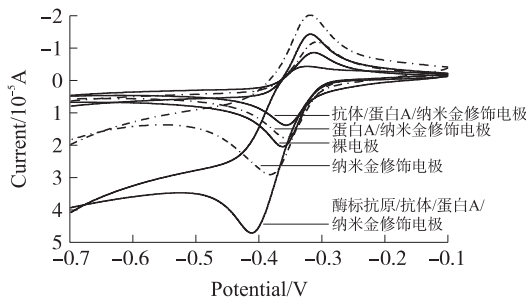


图4 修饰电极的循环伏安法表征图
测试底液为 1 mmol/L、pH 5.5 的硫堇+0.03% H_2O_2 溶液 (Scan rate: 100 mV/s)

2.3 蛋白 A 的作用

比较了未修饰和修饰蛋白 A 电极的测定信号,如图 5 所示。修饰了蛋白 A 的电极,经固定抗体和免疫反应后,测定硫堇-过氧化氢体系的还原电流信号明显增强,而相比之下,未修饰蛋白 A 的免疫电极测定信号小很多。由此得知蛋白 A 在电极的修饰过程中起到重要的作用,可增加抗体固定量并介导抗体有序定向修饰,提高抗体利用率;并且避免了抗体直接固定到纳米金上易失活、在洗脱过程中易脱落的问题,进而提高免疫反应的灵敏度,所以对电流响应有明显增强作用。该免疫传感器与 17β -雌二醇在玻碳电极上的直接差分脉冲伏安法测定比较,灵敏度提高约 4 个数量级^[15]。

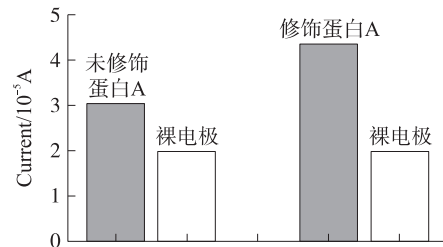


图5 蛋白 A 对测定信号的影响
测试底液为 1 mmol/L、pH 5.5 的硫堇+0.03% H_2O_2 溶液 (Scan rate: 100 mV/s)

2.4 温育时间对测定的影响

考察了温育时间对抗原抗体反应的的影响,结果如图 6 所示。随温育时间的增加,响应信号增大,表示免疫反应需要足够的时间才能完成。当温育时间超过 30 min 后还原峰电流不再增加,说明免疫反应已趋于稳定,所以选择 30 min 作为温育时间。

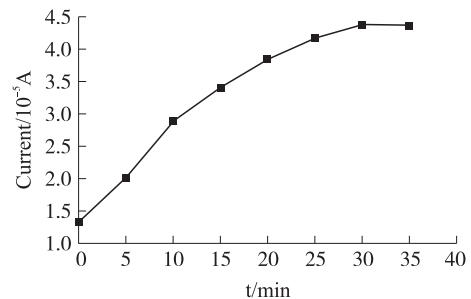


图6 温育时间对最后测定信号的影响

2.5 标准曲线

在优化条件下,用修饰好抗体的免疫电极对 17β -雌二醇标准系列进行测定,标准液中 17β -雌二醇含量与酶催化的硫堇-过氧化氢体系还原峰电流呈负相关,见图 7。 17β -雌二醇含量在 0.1 $\mu\text{g/L}$ ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 范围内与被测信号有良好线性关系, $R^2 = 0.9899$,线性回归方程为 $y = 3.8508 - 0.4843 \lg c$ ($P < 0.05$), 检出

限为 0.035 $\mu\text{g/L}$, 图 8 显示不同浓度 17 β -雌二醇的实际测定曲线。

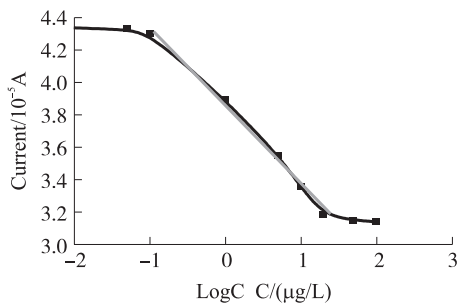


图 7 测定 17 β -雌二醇的标准曲线

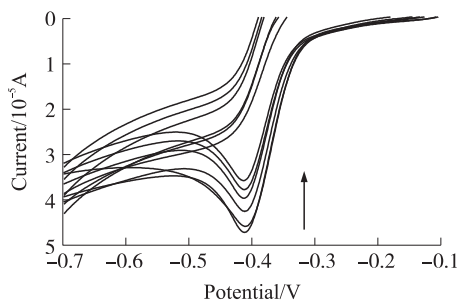


图 8 循环伏安法测定不同浓度 17 β -雌二醇
从下到上 17 β -雌二醇浓度依次为
0、0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$

2.6 方法精密度

选用浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 两个标准溶液分别平行测定 8 次, 结果见表 1, 响应信号的 RSD% 均小于 1%, 该方法一致性较好。

表 1 方法精密度

序号	浓度 $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	测定信号平均值 $(10^{-5} \text{ A}, n=8)$	相对标准偏差 RSD($n=8$)
1	1	3.833	0.2%
2	10	3.363	0.4%

2.7 样品分析

取正常男性和女性(年龄在 23 岁 ~ 28 岁)尿样各 10 份, 测定雌二醇含量, 结果见表 2。男性尿样中 17 β -雌二醇含量在 0 ~ 7 $\mu\text{g/L}$ 之间, 女性由于受排卵周期的影响尿样中 17 β -雌二醇含量范围较宽, 在 10 $\mu\text{g/L}$ ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 之间, 结果与用色谱法测定的相关报道一致^[16]。选择男女各 1 份尿样对精密度进行考察, 结果如表 3, RSD% < 10%, 一致性较好。选择男女各 3 份尿样考察回收率, 结果如表 4, 回收率在 96% ~ 114% 范围内。在免疫电极表面滴上一滴 pH 7.4 的 PBS, 放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 7 d, 对同一样本的测定信号仅下降 1%, 说明该传感器稳定性较好。

表 2 人体尿样中 17 β -雌二醇的测定

尿样	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ ($n=3$)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
男性	1.65	<0.80	3.61	3.48	5.21	<0.80	6.30	<0.80	<0.80	0.90
女性	25.75	13.69	68.24	11.47	69.89	48.46	35.41	82.54	96.56	78.71

表 3 人体尿样中 17 β -雌二醇测定的精密度分析

尿样	测定平均值 $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ ($n=8$)	相对标准偏差 RSD/% ($n=8$)
男性	5.31	6.0%
女性	81.96	6.5%

表 4 人体尿样中 17 β -雌二醇含量的加标回收率测定

尿样 序号	本底值 $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	加入量 $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	测得量 $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收率	
男性	1	3.48	5	9.13	113%
	2	5.21	5	10.14	99%
	3	6.30	5	11.98	114%
女性	1	35.41	50	87.38	104%
	2	48.46	50	96.56	96%
	3	78.71	50	127.22	97%

3 结论

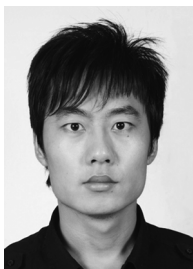
本文研究了基于纳米金和蛋白 A 修饰电极的

免疫传感器, 对 17 β -雌二醇的测定显示了非常高的灵敏度, 测定实际样品结果较好, 有望应用于环境、食品、动物体液中该物质的快速测定, 对于其它激素类物质的测定也有一定借鉴价值。

参考文献:

- [1] 吴明红, 任来堂, 徐刚, 等. 甾体雌激素的污染水平及转化机制 [J]. 自然杂志, 2010, 32(2): 76-79.
- [2] Mathur P P, D'Cruz S C. The Effect of Environmental Contaminants on Testicular Function [J]. Asian J Androl, 2011, 13(4): 585-591.
- [3] Ociepa-Zawal M, Rubis B, Wawrzynczak D, et al. Accumulation of Environmental Estrogens in Adipose Tissue of Breast Cancer Patients [J]. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2010, 45(3): 305-312.
- [4] Hanselman T A, Graetz D A, Wilkie A C. Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review [J]. Environ Sci Technol, 2003, 37(24): 5471-5478.
- [5] Çağlayan M G, Palabiyik I M, Onur F. Development and Validation of Spectrophotometric and High-Performance Column Liquid Chro-

- matographic Methods for the Simultaneous Determination of Dienogest and Estradiol Valerate in Pharmaceutical Preparations [J]. *J AOAC Int*, 2010, 93(3): 862-868.
- [6] Matějček D. On-Line Two-Dimensional Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Determination of Estrogens in Sediments [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(16): 2292-2300.
- [7] Zhang Z, Rhind S M, Kerr C, et al. Selective Pressurized Liquid Extraction of Estrogenic Compounds in Soil and Analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 685(1): 29-35.
- [8] 魏慧斌,林金明,吴丹凝,等. 水体及人体液中的雌二醇的高灵敏度化学发光酶免疫分析[J]. *分析化学*, 2007, 35(3): 320-324.
- [9] Caron E, Sheedy C, Farenhorst A. Development of Competitive ELISAs for 17 Beta-Estradiol and 17 Beta-Estradiol+Estrone+Estriol Using Rabbit Polyclonal Antibodies [J]. *J Environ Sci Health B*, 2010, 45(2): 145-151.
- [10] 汤琳,曾光明,黄国和,等. 免疫传感器用于环境中痕量有害物质检测的研究进展[J]. *环境科学*, 2004, 25(4): 170-176.
- [11] 周谷珍,李继山,蒋健辉,等. 基于酶催化沉积放大的电化学阻抗法用于人免疫球蛋白 M 的检测[J]. *分析化学*, 2006, 34(2): 155-158.
- [12] 陈珠丽,郭希山,朱松明. 基于纳米金修饰丝网印刷电极的乙醇生物传感器[J]. *传感技术学报*, 2009, 22(12): 1686-1689.
- [13] 赵广英,邢丰峰. 基于琼脂糖和纳米金的电流型免疫传感器快速检测副溶血性弧菌[J]. *传感技术学报*, 2007, 20(8): 1697-1700.
- [14] 毛丽莎,孙成均,李永新,等. 柱前荧光衍生-高效液相色谱法测定尿和血清中的环境雌激素[J]. *分析化学*, 2005, 33(1): 33-36.
- [15] Salci B, Biryol I. Voltammetric Investigation of Beta-Estradiol [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 28(3-4): 753-759.
- [16] 吴鸳鸯,施卫星,陈枢青. GC/MS 同时检测人体尿液中 β -雌二醇、双酚 A、己烯雌酚和沙丁胺醇的含量[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2009, 38(3): 235-241.



杨勇(1985-),男,硕士研究生,研究方向为电化学免疫传感器, yangyong_19850522@163.com;



杜晓燕(1954-),女,教授,硕士生导师。主要研究领域为生物传感器及食品、生物检验技术研究, duxiaoyan@163.com。